

β -葡甙酶水解法分析新鲜芹菜的 游离态与糖甙键合态挥发性化合物

汤 坚

何其僮*

(无锡轻工业学院中央研究所)

(美国罗杰斯大学)

摘要 应用Amberlite XAD-2柱及溶剂洗脱法从新鲜芹菜中提取与分离游离态和糖甙键合态的挥发性香气组分。键合态的组分经 β -糖甙酶在37℃, pH=5的缓冲溶液中水解后,释放出挥发性组分。应用气相色谱和色谱质谱联用仪在游离态和键合态中分别鉴定了28个和21个组分。萜烯类、萜烯醇类、酮式萜烯、苯酐类构成了主体香气成分。其中有一些是首次在新鲜芹菜香气中发现。

关键词 芹菜; 苯酐; 萜烯

芹菜(*Apium graveolens* L)作为一种蔬菜常年应市。以芹菜和芹菜籽加工的精油用于化妆品和食品调香。Gold和Wilson^[8]对芹菜的香气成分做了早期研究。Wilson^[9,10,11]先研究了新鲜芹菜精油中的挥发性组分,进而又专门研究了精油中萜类化合物,共找到5种萜类化合物和4种倍半萜,接着他又定量分析了精油中的13种醇。他应用柱分离技术分离提纯了芹菜茎和叶的精油中的羰基化合物,其中有3种苯酐化合物,即3-丁基苯酐,瑟丹交酯,3-丁基六氢苯酐。在这之前Barton^[11]和DeVrs^[11]就曾报道在芹菜籽精油中发现这3种苯酐化合物。大家都一致公认苯酐化合物具有典型的新鲜芹菜香气。由于受当时实验方法的限制,制得的芹菜香气样品多少都有熟芹菜的味道。60年代到70年代,瑟丹交酯和Sedaneolide在气相色谱上的分离效果欠佳。Uhlig^[14]应用高压液相色谱研究了芹菜(celery)、块根芹(celeriac),和独活草(lovage),共12个品种。

本研究的目的是想应用Amberite XAD-2树脂提取与分离新鲜芹菜中游离态和糖甙键合态的挥发性组分,键合态经 β -糖甙酶水解释放出挥发性组分,可以避免和减少加热对样品的影响。以期得到真正的新鲜芹菜的香气。用气相色谱和色谱质谱作定性、定量分析。

在游离态中共有28个组分,其中主要是萜类、苯酐类和Psoralen类,包括单萜6种、萜烯醇2种、酮式萜烯3种、7种苯酐,5种Psoralen。键合态中共有21个组分,其中有25种萜烯醇,4种苯酐。详见表1。

1 实验方法

1.1 Amberlite XAD-2柱子的制备

取适量Amberlite XAD-2树脂(20-60目Aldrich Chmical Company Inc),以甲醇为溶

本文1990年2月21日收到。

*美国罗杰斯大学食品科学系教授

剂湿法装入玻璃柱(50cm \times 1cm 1.D.)然后分别用800ml甲醇、乙腈、乙醚(溶剂全部重蒸)依次洗涤XAD-2树脂,流速控制在1—2ml/min。待乙醚洗完,XAD-2树脂完全干燥之后,储于甲醇中备用。

使用之前将洗净的Amberlite XAD-2树脂依前法装入干净玻璃柱内(50cm \times 1cm.1.D)分别用50ml甲醇、乙醚慢速洗涤,最后用100ml蒸馏水洗涤,即可供使用。

1.2 芹菜样品制备

称取洗净晾干的新鲜Pascal芹菜4000g(超级市场蔬菜柜)切成1.3cm长短,打成浆。立刻以Ciltie 545 (Baker Chemical Co)作为助滤剂,减压过滤。得到3000ml芹菜汁。密封存于锥形瓶中。置于冰浴中,冷却避光保存。

游离态芹菜香气成分洗脱

每次取500ml芹菜汁置于500ml分液漏斗中,让芹菜汁以1—2ml/min的速度经过已净化的XAD-2柱。

全部样品过柱后,以1000ml戊烷:乙醚(1:1v/v)为洗脱剂。以1—2ml/min洗脱游离态组分。收集洗脱液,加入1ml乙醚癸酸甲酯(1mg/ml)溶液作为内标物。用无水硫酸钠干燥之后,在氮气流下吹去溶剂,浓缩至0.5ml即可供气相色谱及色谱质谱联用仪进样分析。

1.3 糖苷键合态成分洗脱

用1000ml甲醇慢速洗脱吸附在XAD-2树脂上的键合态化合物。收集甲醇洗脱液。用200ml戊烷:乙醚(1:1v/v)分3次萃取甲醇洗脱液。除去可能残存的游离态挥发性组分,将所有戊烷:乙醚合并。甲醇洗脱液在旋转蒸发器上减压浓缩,除去全部甲醇(水浴温度为10 $^{\circ}$ C)。残留物用200ml磷酸氢二钾与柠檬酸(Fisher Scientific Co)缓冲液(0.2m, pH=5)完全溶解之后,再加入50mg β -糖苷酶(5.5unit/mg)(Sigma Chmical Co.)样品置于密封锥形瓶

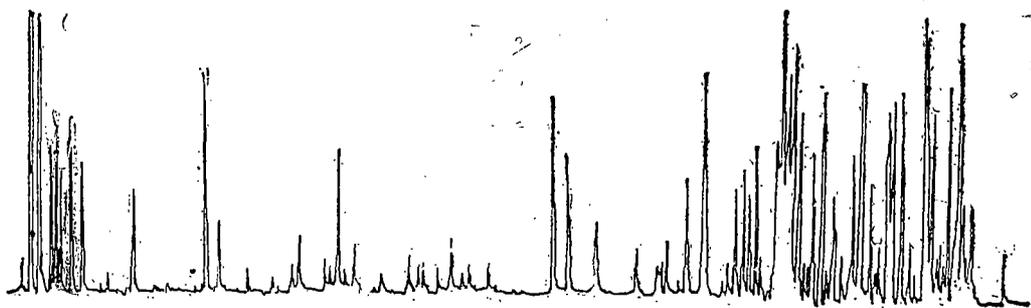


图1 游离态芹菜香气组分的气相色谱图

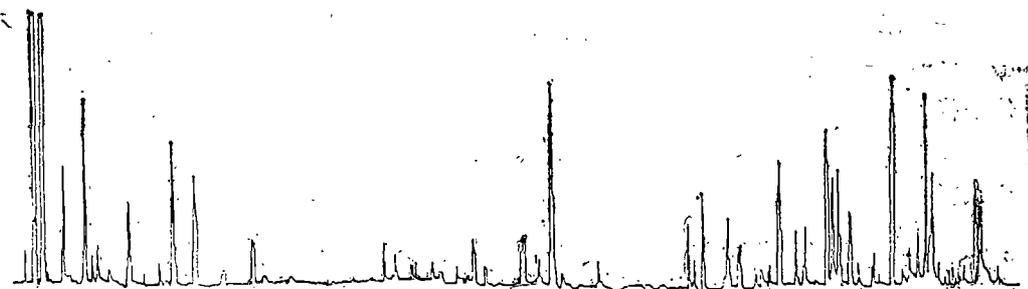


图2 键合态芹菜香气组分的气相色谱图

中在37℃摇床上匀速振荡,水解48h后用250ml二氯甲烷分3次萃取此缓冲液。合并二氯甲烷萃取液,并加入0.5ml癸酸甲酯的乙醚溶液(1mg/ml)为内标物。经无水硫酸钠干燥之后在氮气流下浓缩至0.5ml,供气相色谱及色谱质谱联用仪分析。

1.4 气相色谱分析

Varian 3400气相色谱仪,配有氢火焰离子化检测器,内装60m×0.22mm 1.D.的DB 1石英毛细管色谱柱,膜厚0.25μm,氮气流速1ml/min,分流比为1:100,衰减为11×4,进样器温度270℃,检测器温度为300℃,程序升温40—230℃保持40min,升温速率为20℃/min,进样量1μl。

游离态与糖甙键合态的芹菜香气样品均用此气相色谱条件分析。

1.5 色谱质谱分析

Finnigan MAT 8230质谱仪配有Varian 3400气相色谱仪。

气相色谱条件:DB-1(60m×0.32mm 1.D)石英毛细管色谱柱。膜厚0.50μm,进样器温度270℃,升温程序为40—175℃(2℃/min)—230℃(4℃/min)保持40min,分流比为1:50。

质谱条件:

电子轰击方式,扫描范围35—350AMU,扫描速度35—350AMU/1.75sec,电离室温度220℃,根据所得质谱图鉴定化合物结构。

表1 芹菜香味中游离态与键合态组分与含量

组 分	游离态含量(ppm)	键合态含量(ppm)
萜烯		
α-蒎烯	痕	
β-蒎烯	0.015	
对伞花烃	0.023	
苧烯	0.271	
蒎烯	痕	
γ-松油烯	0.027	
萜醇		
α-松油醇	痕	
反-香芹醇	0.032	0.011
对-蒎烯醇-2		0.089
4-烯蒎醇		0.021
对-1,8-二蒎烯醇-9		0.034
倍半萜		0.210
石竹烯	0.044	
酮式萜烯		
樟脑	0.013	
二氢香芹酮	痕	
马鞭烯酮苯	0.023	

续表 1

苯酞		
3-丁基苯酞	0.867	0.310
反-3-丁叉苯酞	0.182	
Sedanenolide	20.402	0.485
cis-Ligustilide	2.179	0.305
trans-Ligustilide	0.275	0.041
瑟丹交酯	4.391	0.285
3-戊酰4,5-二氢苯酞	痕	
Psoralens		
Psoralen	0.273	
9-methoxyl, Psoralen	0.057	
4-methoxyl, Psoralen	0.020	
Ptoralen, 4,9-dimethoxyl,	0.244	
菎若亭	痕	0.544
其它		
2-己烯醇-1	0.862	
己醇	0.116	
环己酮		0.074
2-戊基呋喃	0.035	0.023
酚		痕
辛酸甲酯		0.096
十一烷酮-2		0.074
4-戊烯基苯		0.067
十二酸甲酯		0.031
棕榈酸		0.247
亚油酸	1.775	
乙酸乙酯		0.321
环己烯		0.477
己酮-2		0.013

注:以癸酸甲酯溶液(1mg/ml)为内标,按气相色谱峰面积计算。

2 结果与讨论

应用本实验方法测得的芹菜香气中的主要组分是萜烯,苯酞和Psoralen三类。

2.1 萜烯

在游离态芹菜香气中检出了6种单萜,它们是 α -蒎烯, β -蒎烯,对-伞花烃,苧烯,

γ -松油烯, 蒎烯-3。蒎烯是第一次发现存在于芹菜香气之中。其中的蒎烯含量最多达0.271 ppm。远多于其它几种萜的总量。这与Wilson^[9]在芹菜精油样品中得到的结果一致。

α -蒎烯, β -蒎烯给人以特有的松木香气感觉。对-伞花烃有强烈的胡萝卜气味, 蒎烯有令人愉快的柠檬样香气, γ -松油烯的气味与蒎烯相类似。汤坚等人^[13]在无锡毫茶香气中检出蒎烯、蒎烯。芹菜香气中我们检出的唯一倍半萜石竹烯其含量仅0.044ppm, 值得注意的是这些萜烯化合物在芹菜香气的键合态馏分中已消失得一干二净。这是因为它们全部被戊烷-乙醚从XAD-2柱子上洗脱。

在游离态组分中还有2种萜烯醇, 即 α -松油烯醇与反-香芹醇, 含量分别为痕量与0.032 ppm。前者具有特有的丁子香香气, 反-香芹醇则略带芹菜香。在键合态中有包括前二者在内的5种萜醇。它们是 β -蒎烯-2-醇, 4-蒎烯醇, 对-1, 8-蒎二烯-9-醇。后者含量较多达0.210ppm。这些醇所以富集在键合态组分中是由于羟基与糖形成糖甙键合态存在于芹菜中, 并被XAD-2树脂吸附, 只有用强极性的溶剂如甲醇等才能有效地洗脱。 β -蒎烯-2-醇, 4-蒎烯醇及对-1, 8-蒎二烯-9-醇也是首次在新鲜芹菜香气中发现。

在芹菜游离态组分中还有3种羰基化合物、樟脑、二氢香芹酮和马鞭烯酮。当樟脑浓度大时, 给人辛辣感刺鼻, 但稀时有清凉感。二氢香芹酮则带有强烈的药草气息及香柠风味。樟脑与马鞭烯酮都是首次在新鲜芹菜香气中发现的。

萜烯类化合物对于芹菜香味有着很重要的贡献, 也是芹菜常带有清凉草药味的原因。萜类是很多植物的成分, 所以广泛地存在于很多植物的香味中^[12]但正是因为萜烯类对光、热、酸、碱很不稳定, 在以往的分析中常常因此而改变, 本方法严格控制加热或不加热以期获得纯真的芹菜香气。

2.2 苯酞(Phthalide)

严格说来苯酞应是 γ -内酯化合物。

在游离态芹菜香气中发现了7种苯酞化合物。它们是3-丁基苯酞, 反-3-丁叉苯酞, Sedanenolide, 顺-和反-Ligustilide, 瑟丹交酯和3-戊酰-4, 5-二氢苯酞。(质谱数据见表2)。

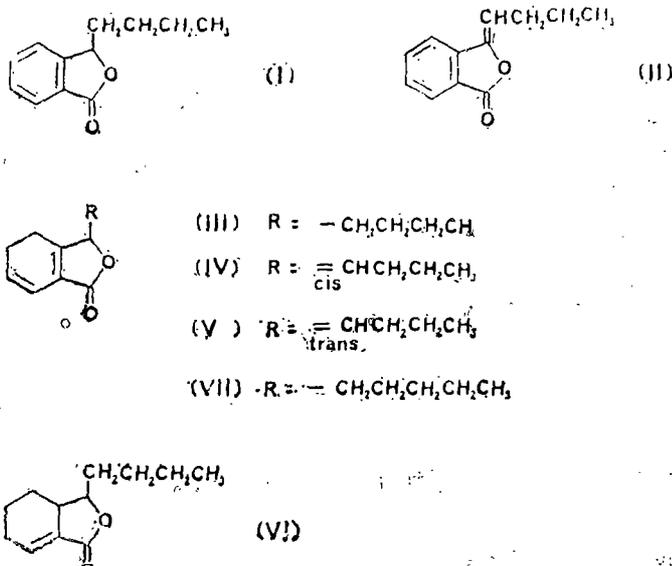


表2 苯酞化合物的质谱数据

化合物名称		m/e (相对强度)
3-丁基苯酞	I	190(7), 172(2), 144(4), 134(14), 133(100), 106(4), 105(36), 77(18), 76(5), 51(8), M ⁺ : 190
反-3-丁叉苯酞	II	188(25), 160(14), 159(100), 146(35), 131(32), 102(26), 81(17), 77(21), 76(16), 55(10), M ⁺ : 188
Sedanenolide	III	192(30), 163(3), 135(6), 108(13), 107(100), 105(6), 85(14), 79(39), 78(16), 57(9), 51(7), M ⁺ : 192
cis-Ligustilide	IV	190(61), 162(14), 161(100), 148(80), 133(15), 198(22), 106(35), 105(39), 78(26), 77(27), 55(58), M ⁺ : 190
trans-Ligustilide	V	190(59), 162(16), 111(100), 148(84), 134(16), 133(28), 107(15), 106(42), 105(64), 78(36), 77(39), 55(78), M ⁺ : 190
瑟丹交酯	VI	194(10), 137(41), 109(59), 108(100), 81(34), 80(49), 79(79), 77(18), 53(12), 41(23), M ⁺ :
3-戊酰4,5-二 氢苯酞	VII	206(8), 190(4), 148(9), 133(15), 108(15), 108(22), 107(100), 99(14), 91(13), 79(40), 77(41), 55(17), M ⁺ : 206

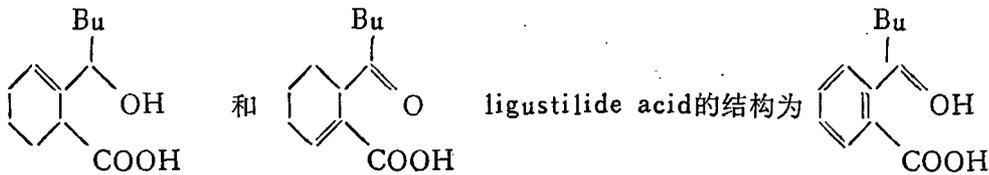
Barton 和 Devries(1963)曾在芹菜籽精油中发现苯酞化合物。随后 Wilson^[11]应用气相色谱定量测定了新鲜芹菜精油中的3-丁基苯酞和Sedanenolide, 含量不一样, 这与取样和抽提方法的差异有关, 但都一致公认苯酞化合物构成典型的新鲜芹菜的香气。Berlingozz 和 Clone^[2]提出在C₃位上的一个氢原子被烷基取代的苯酞具有强烈的芹菜香味, 如3-正丁基苯酞, 而当C₃位上的2个氢原子都被烷基取代, 这种苯酞的芹菜味显著变弱, 而当其中一个取代基是芳叉基时, 此苯酞的芹菜味又会增强。由此可见苯酞的芹菜味是与C₃上取代基的种类和数目都有密切关系。

本实验方法测得苯酞化合物中以Sedanenolide含量最高为20.4ppm。为了解决气相色谱分析法由于苯酞对热不稳定所造成的误差, Lund^[5]应用高压液相色谱法和薄层层析法得芹菜籽精油中3-丁基苯酞和Sedanenolide的含量达3%—10%。他未能检出瑟丹交酯。Uhlig^[14]应用高压液测定了8个品种的芹菜, 3个品种块根芹和独活草共12个样品中3种苯酞的含量。其结果表明Sedanenolide≫3-丁基苯酞>瑟丹交酯, 唯有独活草是例外, Sedanenolide和瑟丹交酯都未检出。瑟丹交酯含量很低, 又是聚接在高含量的Sedanenolide之后出峰, 状如Sedan-enolide的肩峰会造成较大的计算误差。这3种苯酞对芹菜香味的贡献亦不一样, 3-丁基苯酞及瑟丹交酯比Sedanenolide要灵敏5倍。

Toulemonde^[7]报道独活草根的精油具有浓重的芹菜味, 分析结果表明其中苯酞化合物

占了70%左右。他同时应用色谱质谱联用仪和色谱红外联用仪共鉴定了14种苯酐化合物, 获得了成功。

我们在键合态成分中发现3-丁基苯酐、Sedanenolide, 瑟丹交酯, Cis-和trans-ligustilide其含量都比在游离态中少得多。为什么结构上属于内酯的苯酐化合物会出现在糖甙键合态馏分中呢? 在新鲜芹菜中会有一些有机酸如瑟丹酸, 是 γ -羟基酸, 它可以与糖键合被吸附在Amberlite XAD-2树脂上, 随甲醇洗脱而下, 经 β -糖甙酶水解脱去糖, 恢复成瑟丹酸。可能在气相色谱或色谱质谱分析过程中受到高温的影响失去一分子水, 生成瑟丹交酯。Gijbels^[4]提出瑟丹酸有2种形式:



因为这些酸对热都很不稳定, 所以用蒸馏法制得的精油中的这些酸都被破坏。其它的苯酐化合物也有同样的可能性, 这一问题仍有待进一步的研究。

2.3 Psoralen化合物

在游离态芹菜香气中有4种Psoralen化合物。它们是Psoralen; 9-甲氧基, Psoralen; 4-甲氧基, Psoralen; 和9,4-二甲氧基, Psoralen。后3种是第一次在新鲜芹菜中发现。此外尚有莨菪亭。Psoralen天然存在于柑橘科、伞形科、豆科和桑科等数十种植物中。这些化合物在芹菜香气中并不起作用。

致 谢

感谢美国罗杰斯大学食品科学系质谱实验室Thomas G Hartman在质谱分析中给予帮助。

感谢吴萍与张远刚同志在实验中给予的协助。

参 考 文 献

- 1 Barton DHR and DeVries J X, The Constitution of Sedanolide J Chem Soc, 1963; 1916
- 2 Berlingogzi S and Clone L, Gazz Chim Ital, 1927; 57, 243
- 3 Budavari S, The Merck Index, 11th ed, Merck & Co, Inc 1989
- 4 Gijbels M J M, et al, Phthalides in Umbelliferae, Rivista Italiana EPP O S, 1979
- 5 Lund E D, Flavors and non-alcoholic Beverages Thin Layer and HPLC Analysis of Celery Seed Oil, J Assoc Off Anal Chem, 1978; 61: 1083

- 6 Straten SV. Volatile Compounds in Foods Central Institute for Nutrition and Food Research TNO Zaist, Netherlands, 1977
- 7 Toulemonde, et al. Phthalides from lovage Flavour Science and Technology. John Wiley Sons Ltd, 1987
- 8 Gold H J and Wilson CW. III The Volatile Flavor Substances of Celery. J Food Sci, 1963; 28, 474
- 9 Wilson CW. III Terpene and Sesquiterpene Hydrocarbons in the Essential Oil from Fresh Celery. J Food Sci, 1969; 34, 521
- 10 Wilson C W. III Identification and Quantitation Estimation of Alcohols in Celery Essential Oil J Food Sci 34, 535(1969 b)
- 11 Wilson, C W. III Relative Recovery and Identification of Carbonyl Compounds from Celery Essential Oil. J Food Sci, 1970; 35, 766
- 12 龙康侯, 苏镜娱等. 萜类化学. 高等教育出版社, 1984
- 13 汤坚, 袁身淑, 刘扬岷, 王林祥. 无锡毫茶香气成分的分析与鉴定. 无锡轻工业学院学报, 1989; 8(2): 21
- 14 Uhlig J W, Chang Aand Ten J J. Effect of Phthalides on Celery Flavor. J Food Sci, 1987; 52, 658

Identificaton of Free and Glycosidically Bonded Voilatle Compounds in Fresh Celery by β-glucosidase Hydrolysis

Tang Jian

Ho Chitang

(Centre Institute)

Rutgers Univ. U.S.A)

Abstract Free and glycosidically bonded volatiles from fresh pascal celery were isolated and separated by an Amberlite XAD-2 resin. The volatile components from bonded fraction were released by β-glucosidase hydrolysis in a buffer (pH=5) at 37° C for 48h. Total of 28 and 21 compounds were found and quantitated in free and bonded fractions respectively by GC and GC/MS. Terpenes, terpene alcohols, terpene ketones and phthalides were the major components of fresh celery stalk flavor. Some of them were reported first time in fresh celery flavor.

Keywords Celery; β-glucosidase; Terpene; Phthalide